



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 16 818 A 1**

⑤① Int. Cl. 6:  
**A 61 K 9/56**  
B 01 J 13/02

②① Aktenzeichen: P 44 16 818.7  
②② Anmeldetag: 11. 5. 94  
④③ Offenlegungstag: 16. 11. 95

DE 44 16 818 A 1

⑦① Anmelder:  
Schering AG, 13353 Berlin, DE

⑦② Erfinder:  
Heldmann, Dieter, Dr., 10555 Berlin, DE; Hauff, Peter,  
Dr., 12627 Berlin, DE

⑤④ Neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, diese enthaltende Mittel, deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten Freisetzung von Wirkstoffen sowie Verfahren zu deren Herstellung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas oder eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten in vivo Wirkstoff-Freisetzung, sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

DE 44 16 818 A 1

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas bzw. eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten in vivo Wirkstoff-Freisetzung, zur ultraschallunterstützten Zellinkorporation von Wirkstoffen (Sonoporation) sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

Mikropartikuläre Systeme zur kontrollierten Wirkstofffreigabe gibt es schon seit vielen Jahren. Eine Vielzahl an möglichen Hüllsubstanzen und Wirkstoffen läßt sich hierzu verwenden. Ebenso gibt es eine ganze Reihe unterschiedlicher Herstellungsverfahren. Zusammenstellungen über die verwendeten Hüllsubstanzen und Herstellungsverfahren finden sich z. B. bei: M. Bornschein, P. Melegari, C. Bismarck, S. Keipert: Mikro- und Nanopartikeln als Arzneistoffträgersysteme unter besonderer Berücksichtigung der Herstellungsmethoden, Pharmazie 44 (1989) 585—593 und M. Chasin, R. Langer (eds.): Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New York, 1990.

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus mikropartikulären Systemen beruht überwiegend auf Diffusions- oder Erosionsprozessen [vgl. C. Washington: Drug release from microdisperse systems: A critical review, Int. J. Pharm. 58 (1990) 1—12 und J. Heller: Bioerodible Systems, in: R.S. Lahger, D.L. Wice (eds.): Medical applications of controlled release Vol. 1, CRC Press, Florida, 1984, p. 69—101].

Diese Prinzipien sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß die zeitliche Steuerbarkeit der Wirkstofffreisetzung aus mikrodispersen Systemen in vivo auf die Geschwindigkeit des Erosionsprozesses und/oder Diffusionsprozesses begrenzt ist und nach Applikation nicht weiter beeinflußt werden kann.

Die bislang bekannten Konzepte zur örtlichen Steuerung der Wirkstofffreisetzung in vivo aus mikropartikulären Systemen beruhen fast ausschließlich entweder auf unspezifischen Anreicherungen der mikropartikulären Wirkstoffträger in bestimmten Zielorganen wie Leber und Milz oder auf Maßnahmen zur gezielten Veränderung der Organverteilung in vivo nach Applikation durch die Veränderung der Oberflächeneigenschaften der mikropartikulären Systeme mit Hilfe von Tensiden oder spezifitätsvermittelnden Stoffen wie z. B. Antikörpern [vgl.: R.H. Müller: Colloidal carriers for controlled drug delivery — Modification, characterization and in vivo distribution —, Kiel, 1989; S. D. Tröster, U. Müller, J. Kreuter: Modification of the biodistribution of poly(methylmethacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants, Int. J. Pharm. 61 (1991), 85—100; S.S. Davis, L. Illum, J.G. Movie, E. Tomlinson (eds.): Microspheres and drug therapy, Elsevier science publishers B.V., 1984 und H. Tsuji, S. Osaka, H. Kiwada: Targeting of liposomes surfacemodified with glycyrrhizin to the liver, Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 1004—1008]. Alle diese Verfahren bieten darüber hinaus jedoch keine weitere Möglichkeit den Ort der Wirkstofffreisetzung nach Applikation aktiv zu beeinflussen. Des weiteren ist es nicht möglich, das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe nach Applikation zu beeinflussen.

Erste Versuche, aktiv den Ort der Wirkstofffreisetzung zu beeinflussen, beruhen auf der Möglichkeit, vorhandene, bzw. induzierte pH- oder Temperaturdiffe-

renzen zur Freisetzung zu benutzen [vgl.: H. Hazemoto, M. Harada, N. Kamatsubara, M. Haga, Y. Kato: PH-sensitive liposomes composed of phosphatidyl-ethanolamine and fatty acid, Chem. Pharm. Bull. 38 (1990) 748—751 und J.N. Weinstein, R.L. Magin, M.B. Gatwin, D.S. Zaharko: Liposomes and local hyperthermia, Science 204 (1979) 188—191]. Diese Methoden sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß sie entweder begrenzt sind auf Fälle wo die erforderlichen Temperatur- bzw. pH-Differenzen bereits vorliegen (z. B. im Tumorgewebe) oder die entsprechenden zur Freisetzung erforderlichen Parameter nur durch aufwendige, z. T. invasive Maßnahmen herbeigeführt werden müssen. Darüber hinaus ist im letzteren Fall die örtliche Auflösung gering.

Ein weiteres bekanntes Verfahren, den Ort der Wirkstofffreisetzung zu beeinflussen, besteht in der Verwendung von Mikropartikeln, die durch in den Partikeln verkapselte Ferrofluide über äußerlich angelegte Magnetfelder innerhalb bestimmter Körpersegmente anreicherbar sind [K.J. Widder, A.E. Senyei: Magnetic microspheres: A vehicle for selective targeting of drugs, Pharmac. Ther. 20 (1983) 377—395]. Die Verwendung derartiger Mikropartikel erfordert allerdings die gleichzeitige gezielte Anwendung starker, fokussierbarer Magnetfelder. Magnete, die derartige Felder erzeugen, sind jedoch in der Medizin wenig verbreitet. Desweiteren läßt sich die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe auf diese Weise nicht beeinflussen.

In der US-Patentschrift 4,657,543 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem die Freisetzung durch Ultraschalleinwirkung auf wirkstoffhaltige Polymerblöcke hervorgerufen wird. Dieser Effekt beruht im wesentlichen auf einer verstärkten Erosion des Polymers unter Schalleinwirkung. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß es nur für ortsfeste Implantate geeignet ist. Für deutliche Effekte ist zudem die Verwendung sehr hoher Schalldrücke oder von Dauerschallsignalen notwendig, die zur Gewebeschädigung führen können.

In der WO 92/22298 werden Liposomen beschrieben, die sich durch Einstrahlung von Ultraschall, der im Bereich der Resonanzfrequenz der Mikrobläschen liegt, zerstören lassen. Dabei tritt der verkapselte Wirkstoff aus. Die Resonanzfrequenz wird mit ca. 7,5 MHz angegeben. Diagnostischer Ultraschall derart hoher Frequenz weist jedoch aufgrund der hohen Absorption durch Körpergewebe nur eine geringe Eindringtiefe (wenige Zentimeter) auf. Die beschriebenen Liposomen sind deshalb nur für die Freisetzung von Wirkstoffen in oberflächennahen Gebieten des Körpers geeignet.

Bei der Verwendung von Nukleinsäuren als Wirkstoffe werden in der Literatur zwei Systeme basierend auf viralen Vektoren bzw. nicht-virale Vektoren beschrieben. In vivo werden derzeit als virale Vektoren Retro-, Adeno- und Herpesviren (bzw. deren Rekombinanten) und als nicht-virale Vektoren Liposomen und Liganden zelloberflächenspezifischer Rezeptoren untersucht (G.Y. Wu & C. H. Wu: Delivery systems for gene therapy, Biotherapy, 3 (1991) 87—95 und F. D. Ledley: Are contemporary methods for somatic gene therapy suitable for clinical applications?, Clin Invest Med 16 (1) (1993) 78—88).

Erste Untersuchungen zur Verwendung der Gentherapie beim Menschen konzentrieren sich auf genetisch bedingte Erkrankungen wie z. B. alpha-1-Antitrypsinmangel, zystische Fibrose, Adenosindesaminasemangel und maligner Tumoren wie z. B. Melanome, Mammatumore und Intestinalkarzinome.

Bislang sind jedoch keine Vektoren bekannt, die so-

wohl eine räumliche als auch zeitliche Steuerung der Freisetzung von Nukleinsäuren ermöglichen.

Es besteht daher für vielfältige Zwecke weiterhin ein Bedarf an gezielt applizierbaren Formulierungen, die die genannten Nachteile des Standes der Technik überwinden, d. h. bei denen sowohl der Ort und Zeitpunkt der Wirkstofffreisetzung als auch die Menge der abgegebenen Substanz, gezielt durch einfache, nicht invasive Maßnahmen gesteuert werden kann. Die Formulierungen sollten darüber hinaus eine hohe Stabilität, insbesondere in Hinblick auf mechanische Einflüsse, aufweisen.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, derartige Formulierungen zur Verfügung zu stellen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung zu schaffen.

Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß bei mikropartikulären Systemen, die zusammengesetzt sind aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln, die aus einer bioabbaubaren Hülle und einem gas- und wirkstoffhaltigen Kern bestehen, überraschenderweise bei der Bestrahlung mit diagnostischen Ultraschallwellen in einem Frequenzbereich der unterhalb der Resonanzfrequenz der Partikel liegt, die Hülle dieser Partikel zerstört wird und so der (die) verkapselte(n) Wirkstoff(e) gezielt freigesetzt wird (werden).

Die Erfindung betrifft somit neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die neben dem Wirkstoff ein Gas, eine gasförmige Phase oder Gasgemische enthalten, sowie mikropartikuläre Systeme bestehend aus den erfindungsgemäßen Mikropartikeln sowie einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium.

Die Partikel weisen eine Dichte kleiner als  $0,8 \text{ g/cm}^3$ , bevorzugt kleiner als  $0,6 \text{ g/cm}^3$  auf und haben eine Größe im Bereich von  $0,1 - 8 \text{ }\mu\text{m}$ , vorzugsweise  $0,3 - 7 \text{ }\mu\text{m}$ . Im Falle von verkapselten Zellen beträgt die bevorzugte Partikelgröße  $5 - 10 \text{ }\mu\text{m}$ . Aufgrund der geringen Größe verteilen sie sich nach i.v. Injektion innerhalb des gesamten Gefäßsystems. Unter Sichtkontrolle auf dem Monitor eines diagnostischen Ultraschallgerätes kann dann durch Intensivierung des Schallsignals eine vom Anwender gesteuerte Freisetzung der enthaltenen Stoffe herbeigeführt werden, wobei die zur Freisetzung erforderliche Frequenz unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikropartikel liegt. Geeignete Frequenzen liegen im Bereich von  $1 - 6 \text{ MHz}$ , bevorzugt zwischen  $1,5$  und  $5 \text{ MHz}$ .

Dadurch ist erstmalig innerhalb des gesamten Körpers eine kombinierte Steuerung der Wirkstofffreigabe und des Wirkstofffreigabeortes durch den Anwender möglich. Diese Freisetzung, durch Zerstörung der Partikelhülle, ist überraschenderweise auch mit Ultraschallfrequenzen weit unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikrobläschen mit in der medizinischen Diagnostik üblichen Schalldrücken möglich, ohne daß es zu einer Erwärmung des Gewebes kommt. Dieses ist besonders deswegen bemerkenswert, weil auf Grund der großen mechanischen Stabilität der Partikelhülle — wie sie z. B. in Hinblick auf Lagerstabilität von Vorteil ist — eine Zerstörung der Hülle mit relativ energiearmer Strahlung nicht zu erwarten war.

Die Wirkstofffreigabe kann aufgrund des hohen Gasanteils der Partikel und der damit verbundenen Echogenität, in vivo über die Abnahme des empfangenen Ultraschallsignals kontrolliert werden.

Weiterhin wurde gefunden, daß bei Anwendung erfindungsgemäßer mikropartikulärer Systeme ein verbesserter Transfer von Wirkstoffen in die Zellen erzielt

werden kann (Sonoporation).

Außerdem wurde gefunden, daß die aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen freigesetzten Wirkstoffe im Vergleich zu dem reinen Wirkstoff überraschenderweise eine erhöhte pharmakologische Wirksamkeit zeigen.

Die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme sind aufgrund ihrer Eigenschaften für eine gezielte Freisetzung von Wirkstoffen und deren erhöhten Transfer in die Zielzellen unter Einwirkung von diagnostischem Ultraschall geeignet.

Als Hüllmaterialien für die Gas/Wirkstoff enthaltenden Mikropartikel eignen sich prinzipiell alle biologisch abbaubaren und physiologisch verträglichen Materialien, wie z. B. Proteine wie Albumin, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate wie z. B. succinylierte Gelatine, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol (z. B. mit Polyethylenglykol konjugiertes Albumin), Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin, biologisch abbaubare synthetische Polymere wie Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton und deren Gemische. Besonders geeignet sind Albumin, Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polycarbonate, Polyaminosäuren, Poly- $\epsilon$ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und  $\epsilon$ -Caprolacton.

Das (die) eingeschlossene(n) Gas(e) können beliebig gewählt werden, wobei jedoch physiologisch unbedenkliche Gase wie Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Edelgase, halogenierte Kohlenwasserstoffe,  $\text{SF}_6$  oder deren Gemische bevorzugt sind. Ebenfalls geeignet sind Ammoniak, Kohlendioxid sowie dampfförmige Flüssigkeiten, wie z. B. Wasserdampf oder niedrigsiedende Flüssigkeiten (Siedepunkt  $< 37^\circ\text{C}$ ).

Der pharmazeutische Wirkstoff kann ebenfalls beliebig gewählt werden. Als Beispiele seien genannt Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile von bakteriologischen Zellwänden, Peptide wie z. B. Endothelin, Proteine, Glycoproteine, Hormone, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, trombolytische Agentien, tumornekrose Faktoren, Zytokine (wie z. B. Interleukine, koloniestimulierende Faktoren wie GM-CSF, M-CSF, G-CSF) und/oder Prostaglandine. Die erfindungsgemäßen Mikropartikeln eignen sich insbesondere zur Verkapselung von Nukleinsäuren, ganzen Zellen und/oder Zellbestandteilen, die (z. B. bei der Gentherapie) im Zielorgan mittels Ultraschall freigesetzt werden sollen.

Der Begriff pharmazeutischer Wirkstoff schließt sowohl die natürlichen, als auch die synthetisch oder gentechnologisch hergestellten Wirkstoffe ein.

Bevorzugt werden pharmazeutische Wirkstoffe verwendet, deren applizierte Dosis (bei bolusförmiger Injektion)  $100 \text{ mg}$  pro Anwendung nicht übersteigt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen, wie zuvor beschrieben, eine Erhöhung der pharmakologischen Wirksamkeit erreicht wird, wobei in verschiedenen Fällen eine Wirkungsverstärkung beobachtet werden kann, wodurch die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme auch für Wirkstoffe einsetzbar sind, die auf konventionellem Wege im Bolus höher als  $100 \text{ mg}$  pro Anwendung dosiert werden müssen.

Sind noch höhere Dosierungen erforderlich, so empfiehlt es sich die Mittel über einen längeren Zeitraum als Infusionslösung zu verabreichen.

Obgleich es über die genannten Limitierungen hinaus keine weiteren Einschränkungen gibt, können die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme besonders dort mit Vorteil eingesetzt werden, wo es aufgrund einer geringen in vivo Lebensdauer des Wirkstoffs in freier Form nicht oder nur in beschränktem Ausmaß möglich ist, das Zielorgan zu erreichen, ohne daß zuvor Zersetzung des Wirkstoffs eingetreten ist. Zu derartigen Wirkstoffen zählen verschiedene Hormone, Peptide, Proteine, Zellen und deren Bestandteile sowie Nukleinsäuren.

Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel besteht darin, daß zunächst in an sich bekannter Weise (DE 38 03 972, WO 93/00933, EP 0 514 790, WO 92/17213, US 5,147,631, WO 91/12823, EP 0 048 745) gasgefüllte Mikropartikel hergestellt werden. Erfindungsgemäß werden diese dann mit in überkritischen Gasen gelösten Wirkstoffen befüllt. Dazu werden die mit geeigneten Verfahren getrockneten (z. B. Gefriertrocknung) gashaltigen Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas in einem Autoklaven behandelt. Zweckmäßigerweise verfährt man, indem Wirkstoff und gasgefüllter Mikropartikel gemeinsam in einem Autoklaven vorgelegt werden und dieser anschließend mit dem überkritischen Gas oder Gasgemisch befüllt wird. Als überkritische Gase eignen sich je nach Wirkstoff alle Gase, die in einen überkritischen Zustand überführt werden können, insbesondere jedoch überkritisches Kohlendioxid, überkritischer Stickstoff, überkritischer Ammoniak sowie überkritische Edelgase. Nach der Behandlung der Mikropartikel mit der Lösung des Wirkstoffs im überkritischen Gas oder Gasgemisch wird der überschüssige Wirkstoff an der äußeren Oberfläche der Mikropartikel falls erforderlich durch Waschen der Mikropartikel in einem geeigneten Medium entfernt und die so gereinigten Partikel gewünschtenfalls gefriertrocknet. Dieses Verfahren ist für alle Wirkstoffe geeignet, die sich in überkritischen Gasen oder Gasgemischen lösen, wie z. B. Peptide oder lipophile Arzneistoffe.

Ein alternatives Verfahren, das sich insbesondere zur Verkapselung von Wirkstoffen die in überkritischen Gasen oder Gasgemischen unlöslich sind (wie z. B. Proteine, zuckerhaltige Verbindungen), eignet, beruht auf der Verkapselung einer wirkstoffhaltigen wäßrigen Phase mittels einer Mehrfachemulsion. Als besonders geeignet haben sich Wasser/Öl/Wasser (W/O/W)-Emulsionen erwiesen. Dazu wird das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von 0,01–20% (m/V) gelöst. In diese Lösung wird eine wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert, daß eine Emulsion vom Typ W/O entsteht. Beide Lösungen können zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten. Bevorzugt ist es jedoch, aus Gründen der im allgemeinen begrenzten biologischen Verträglichkeit von Emulgatoren, auf diese weitgehend zu verzichten. Als vorteilhaft hat es sich erwiesen, der inneren wäßrigen Phase pharmazeutisch akzeptable Quasiemulgatoren wie z. B. Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Gelatine, Albumin oder Dextrane im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 25% zuzusetzen. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, in der inneren wäßrigen Phase, gegebenenfalls zusätzlich zu den anderen verwendeten

Hilfsstoffen, 0,1–20% (m/V) eines gut wasserlöslichen pharmazeutisch akzeptablen Salzes oder Zuckers oder Zuckeralkohols, wie z. B. Natriumchlorid, Galaktose, Mannitol, Laktose, Saccharose, Glukose, Natriumhydrogenphosphat zu lösen. Es kann außerdem vorteilhaft sein, die innere wäßrige Phase vor der Emulgierung mit der verwendeten organischen Phase zu sättigen. Die hergestellte Emulsion vom Typ W/O sollte eine mittlere Tröpfchengröße der inneren Phase von ca. 0,1 bis 10 µm aufweisen. Diese Emulsion wird unter Rühren in das mindestens gleiche Volumen einer wäßrigen Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gegeben. Das organische Lösungsmittel wird unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt.

Die erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel werden erforderlichenfalls gewaschen und anschließend so getrocknet, daß die innere Wasserphase ohne Zerstörung der Mikropartikel entfernt wird. Grundsätzlich geeignete Trocknungsverfahren sind die Gefriertrocknung und die Sprühtrocknung. Bevorzugt ist die Gefriertrocknung. Dazu wird in der Suspension der Mikropartikel ein gerüstbildender Hilfsstoff wie z. B. Zucker, Zuckeralkohole, Gelatine, Gelatine-Derivate, Albumin, Aminosäuren, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol in einer Konzentration von ca. 0,5–20% (m/V) gelöst. Die Suspension wird anschließend bei möglichst tiefen Temperaturen, bevorzugt unterhalb ca. –30°C eingefroren und dann gefriergetrocknet. Nach der Gefriertrocknung und Redispersierung in einem geeigneten Suspensionsmedium, lassen sich die entstandenen gashaltigen Mikropartikel der erforderlichen Dichte durch Flotation oder Zentrifugation, von eventuell ebenfalls vorhandenen soliden oder immer noch wassergefüllten Mikropartikeln abtrennen und falls erforderlich, möglichst unter Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefrieretrocknen. Die Mikropartikel enthalten dann den verkapselten Wirkstoff und Gas bzw. gasförmige Phase nebeneinander.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme aus den nach den vorbeschriebenen Verfahren hergestellten Partikel erfolgt durch Resuspendieren der Partikel in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium. Das Resuspendieren in einem geeigneten Medium kann sich unmittelbar an den letzten Verfahrensschritt (die Gefriertrocknung) anschließen, kann aber gewünschtenfalls auch erst durch den behandelnden Arzt vor der Anwendung erfolgen.

In letzterem Fall liegen die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme als ein Kit, bestehend aus einem ersten die Partikel enthaltenden Behälter und einem zweiten das Suspensionsmedium enthaltenden Behälter, vor. Die Größe des ersten Behälters ist so zu wählen, daß auch das Suspensionsmedium in diesem vollständig Platz findet. So kann z. B. mittels einer Spritze über eine im Verschluß des ersten Behälters befindliche Membran, das Suspensionsmedium vollständig zu den Partikeln gegeben werden und durch anschließendes Schütteln die injektionsfertige Suspension hergestellt werden. Als Suspensionsmedien kommen alle dem Fachmann bekannten injizierbaren Medien in Frage, wie z. B. physiologische Kochsalzlösung, Wasser p.i. oder 5%ige Glukoselösung.

Die applizierte Menge richtet sich nach dem jeweilig eingeschlossenen Wirkstoff. Als orientierender oberer Grenzwert kann ein Wert angenommen werden, wie er auch bei konventioneller Verabreichung des jeweiligen Wirkstoffs verwendet werden würde. Aufgrund des wirkungsverstärkenden Effekts sowie der Möglichkeit den



Wirkstoff spezifisch aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären System freizusetzen, liegt die erforderliche Dosis im allgemeinen jedoch unter diesem oberen Grenzwert.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

#### Beispiel 1

##### Coffein-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylat

Gasgefüllte Mikropartikel, die aus Butylcyanacrylsäure gemäß DE 38 03 972 hergestellt wurden, werden unter Zusatz von 2% (m/V) Polyvinylalkohol gefriergetrocknet. Es werden ca.  $3 \cdot 10^9$  Partikel in Form des Lyophilisats zusammen mit 50 mg Coffein in einen Autoklaven gefüllt. Das Gemisch wird bei ca. 45°C und 100–120 bar mit Kohlendioxid behandelt. Die Entfernung des überschüssigen Coffeins wird folgendermaßen durchgeführt: Die dem Autoklaven entnommenen Mikropartikel werden in 3 ml Wasser, das 1% Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die Partikel werden durch Zentrifugation abgetrennt und in 3 ml Wasser, das 1% Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die Zentrifugation mit anschließender Redispersierung in 3 ml Wasser, das 1% Lutrol F 127 gelöst enthält, wird solange wiederholt, bis im Wasser kein Coffein mehr photometrisch bei 273 nm nachgewiesen werden kann.

#### Beispiel 2

##### Fibrinolytische Mikropartikel aus Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

2 g Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50 : 50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingelheim) werden in 20 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 10 mg r t-PA (Geweb plasminogenaktivator) werden in 4 ml einer 4%igen wäßrigen Gelatinelösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 4%igen autoklavierten Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4%iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei –78°C eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf.

#### Beispiel 3

##### in vitro Freisetzung von Coffein durch Ultraschall

1 ml einer nach Beispiel 1 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von  $10^8$  Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer mittleren Schalleistung (Transmit  $\leq 20$  dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine

Prüfung des partikelfreien Wassers auf Coffein bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit  $> 30$  dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun nachweisbares freies Coffein, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte.

#### Beispiel 4

##### in vitro Freisetzung von rekombinantem tissue Plasminogen Aktivator (r t-PA) durch Ultraschall

1 ml einer nach Beispiel 2 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von  $10^8$  Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer geringen Schalleistung (Transmit  $\sim 10$  dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine Prüfung des partikelfreien Wassers auf r t-PA bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit  $> 30$  dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun nachweisbares freies r t-PA, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte. Die mit dem erhöhten Schalldruck behandelte Partikelsuspension weist fibrinolytische Eigenschaften auf.

#### Beispiel 5

##### Mitomycin-haltige Mikropartikel aus Polymilchsäure

2 g Polymilchsäure (MG ca. 20 000) werden in 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 20 mg Mitomycin werden in 15 ml 0,9%iger wäßriger Kochsalzlösung gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 1%igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG ca. 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5%igen Lösung von Polyvinylpyrrolidon (MG ca. 10 000) in Wasser resuspendiert, bei –50°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf. Sie eignen sich auch als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Mitomycin frei.

#### Beispiel 6

##### Vincristinsulfat-haltige Mikropartikel aus Poly-ε-caprolacton

2 g Poly-ε-caprolacton (MG ca. 40 000) werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. 10 mg Vincristinsulfat werden in 15 ml einer 5%igen wäßrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 5%igen Lösung von Humanalbumin in Wasser unter weiterem

Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5%igen Lösung von Humanalbumin in Wasser resuspendiert, bei -50°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Vincristinsulfat frei.

## Beispiel 7

## Ilomedin-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylsäurebutylester

3 g Polycyanacrylsäurebutylester werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. 1 mg Ilomedin wird in 15 ml einer 5%igen wäßrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 2,5%igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 10%igen Lösung von Lactose in Wasser resuspendiert, bei -50°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Ilomedin frei.

## Beispiel 8

## Methylenblau-haltige Mikropartikel aus Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

4 g Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50 : 50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingelheim) werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. 20 mg Methylenblau werden in 4 ml einer 4%igen wäßrigen Gelatinelösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 4%igen autoklavierten Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4%iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei -78°C eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm<sup>3</sup> auf und setzen bei Beschallung mit Ultraschall (Schall-druck > 50 dB, Frequenz 2,5 MHz) Methylenblau frei.

## Beispiel 9

## Nukleinsäurehaltige Mikropartikel (Markergen β-Gal + Albuminpromotor) aus

## Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

0,4 g Polyvinylpyrrolidon ( $k < 18$ ) und 2 g eines Copolymeren aus Milchsäure und Glykolsäure 50 : 50 werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Unter Rühren werden 5 ml einer Lösung von 300 µg Markergen β-Gal mit Albuminpromotor in 0,9%iger Kochsalzlösung zugegeben. Die entstandene Emulsion wird unter Rühren in 200 ml einer 2%igen autoklavierten (121°C, 20 min) Gelatinelösung überführt. Nach 3 h wird die entstandene Suspension in Portionen à 5 ml abgefüllt, bei -55°C eingefroren und anschließend 70 h gefriergetrocknet. Die Vials werden nach Gefriertrocknung mit je 5 ml Wasser resuspendiert und 3 h stehen gelassen. Die flotierten Partikel werden abgenommen in je 2 ml Wasser, das 10% PVP enthält, resuspendiert und nach Einfrieren bei -55°C erneut 90 h gefriergetrocknet.

## Beispiel 10

## In-vitro-Freisetzung von Nukleinsäure (Markergen β-Gal + Albuminpromotor) aus Mikropartikeln

1 Vial einer nukleinsäurehaltigen Mikropartikelpräparation, hergestellt nach Beispiel 9, wird mit 2 ml Wasser resuspendiert. 1 ml der Suspension wird mit Ultraschall behandelt (Probe 1), 1 ml wird nicht mit Ultraschall behandelt (Probe 2). Beide Proben werden zentrifugiert, die partikelarmen Phasen entnommen, durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Die Filtrate werden mittels Gelelektrophorese auf ihren Gehalt an Markergen β-Gal untersucht. Das Filtrat aus Probe 1 enthält ca. 100% mehr β-Gal als das Filtrat aus Probe 2.

## Beispiel 11

## In-vivo-Freisetzung von Nukleinsäure (Markergen β-Gal + Albuminpromotor) aus Mikropartikeln

2 Vials einer nukleinsäurehaltigen Mikropartikelpräparation, hergestellt nach Beispiel 9 werden mit je 2 ml Wasser resuspendiert. Das gesamte Resuspendat wird der narkotisierten Ratte langsam i. v. (ca. 0,5 ml/min) appliziert. Während der Applikation erfolgt eine Beschallung (7,5 MHz) der Leber, welche bis zu 20 min nach Injektionsabschluß fortgeführt wird. 48 Stunden nach der Partikelgabe wird die Leber entnommen und bei -0°C in Isopentan schockgefroren. Der enzymhistochemische Nachweis der neutralen β-Galaktosidase erfolgt an 8–10 µm dicken Gefrierschnitten. Die Gegenfärbung wird mit Kernechtrot durchgeführt. Im Lebergefrierschnitt stellte sich die neutrale β-Galaktosidase — als Ergebnis der Genexpression — diffus verteilt als dunkelblaue Signale dar.

## Patentansprüche

1. Wirkstoffhaltige Mikropartikel, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel neben dem Wirkstoff auch eine gasförmige Phase enthalten.
2. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dichte der Partikel kleiner als 0,8 g/cm<sup>3</sup> ist.
3. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgröße 0,1 – 10 µm ist.
4. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelhül-

le aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymeren aufgebaut ist.

5. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch abbaubares Polymer Proteine, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol, Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin, Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly-ε-caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und ε-Caprolacton oder deren Gemische verwendet wird.

6. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1—5, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile von bakteriologischen Zellwänden, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, trombolytische Agentien, Tumornekrose Faktoren, Nukleinsäuren, Peptide, Proteine, Glykoproteine, Hormone, Zytokine und/oder Prostaglandine enthalten ist.

7. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Zellen und/oder deren Bestandteile enthalten sind.

8. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1—7, dadurch gekennzeichnet, daß als gasförmige Phase Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid, Edelgase, Ammoniak, halogenierte oder teilhalogenierte Kohlenwasserstoffe, SF<sub>6</sub> und/oder Wasserdampf oder niedrigsiedende Flüssigkeiten (Sdp. < 37°C) enthalten sind.

9. Mikropartikuläre Systeme bestehend aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln nach Anspruch 1—8.

10. Mikropartikuläre Systeme nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenden Partikel durch Einstrahlung von diagnostischem Ultraschall unter Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffs zerstört werden können.

11. Verfahren zur gezielten in vivo Wirkstofffreisetzung aus mikropartikulären Systemen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenden Partikel nach der Applikation mit diagnostischem Ultraschall bestrahlt werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Frequenz des diagnostischen Ultraschalls 1—6 bevorzugt 1,5—5 MHz beträgt.

13. Verfahren zur Erhöhung des Transfers von Wirkstoffen in die Zielzellen, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff aus einem mikropartikulären Systemen mittels Ultraschall freigesetzt wird.

14. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß gashaltige Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas, bevorzugt in überkritischem Kohlendioxid, überkritischem Stickstoff, überkritischem Ammoniak sowie überkritischen Edelgasen, in einem Autoklaven behandelt, anschließend gewünschtenfalls gewaschen und gefriergetrocknet werden.

15. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von 0,01—20% (m/V) gelöst wird und in diese Lösung eine

wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert wird, daß eine Wasser in Öl Emulsion mit einer mittleren Teilchengröße der inneren Phase von ca. 0,1 bis 10 µm entsteht, wobei beide Lösungen gegebenenfalls zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten können und man anschließend diese Emulsion unter Rühren in das mindestens gleiche Volumen einer wäßrigen Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gibt, das organische Lösungsmittel unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt, die so erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel falls gewünscht zunächst wäscht und anschließend, falls gewünscht unter Zugabe von gerüstbildenden Hilfsstoffen gefrier- bzw. sprühtrocknet und falls gewünscht in einem geeigneten Suspensionsmedium redispergiert und die Mikropartikel mit einer Dichte kleiner als 0,8 g/cm<sup>3</sup> durch Flotation oder Zentrifugation abtrennt und falls erforderlich, gewünschtenfalls unter erneutem Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefrier- bzw. sprühtrocknet.

16. Verfahren zur Herstellung von mikrodispersen Systemen, dadurch gekennzeichnet, daß Mikropartikel nach Anspruch 1 in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium suspendiert werden.

17. Ein Kit bestehend aus einem ersten Behälter enthaltend die wirkstoff- und gashaltigen Mikropartikel nach Anspruch 1 und einem zweiten Behälter enthaltend eine pharmazeutisch verträgliche Trägerflüssigkeit, die nach Mischen mit dem Inhalt des ersten Behälters eine fließfähige injizierbare Suspension ergibt, wobei a) das Volumen des ersten Behälters so gewählt ist, daß zusätzlich zu den Partikeln auch die Trägerflüssigkeit vollständig Platz darin findet und b) beide Behälter jeweils eine Dosisleistungsmenge an wirkstoffhaltigen Mikropartikeln bzw. Trägerflüssigkeit enthalten.

- Leerseite -